

## L'evoluzione della resistenza e del trattamento dell'influenza

da: [JAMA. 2009; 301\(10\)](#)

*(traduzione a cura della redazione di EpiCentro  
revisione a cura di Caterina Rizzo - Epidemiologia delle malattie infettive, Cnesps - Iss)*

Nel febbraio 2006, i Centers for Disease Control and Prevention (Cdc) americani hanno segnalato che il 92,3% dei virus influenzali del tipo A(H3N2) in circolazione era resistente alle adamantadine (amantadina e ramantidina), 1 delle 2 classi farmacologiche disponibili per il trattamento dell'influenza (1). I virus resistenti presentavano una sostituzione dell'amminoacido S31N della proteina M2 dell'influenza, che conferisce resistenza, ma non ha effetto sulla virulenza. Anche se la resistenza alle adamantadine aumentò al 14,5% nell'anno precedente (2), il drammatico aumento nel 2005-2006 fu uno shock sia per la comunità medica e scientifica che per la popolazione (3).

In quel momento si è ritenuto, con fiducia, che fosse improbabile che l'influenza sviluppasse una simile resistenza agli inibitori della neuraminidasi (oseltamivir e zanamivir), la seconda classe di agenti antimicrobici per l'influenza (4-5). Gli inibitori della neuraminidasi furono messi a punto grazie alla comprensione dell'interazione strutturale tra neuroaminidasi e il suo naturale substrato di acido sialico. Poiché questi antivirali assomigliano all'acido sialico, si era sempre creduto che ogni mutazione all'interno della neuraminidasi, riducendo l'affinità con gli inibitori farmacologici, compromettesse immancabilmente l'idoneità del virus.

Le prove disponibili sostenevano questo assunto. La selezione in vitro di mutanti resistenti all'inibitore della neuraminidasi è generalmente difficile, il che sostiene che le mutazioni associate alla resistenza compromettano la vitalità. In uno studio del 2002 (5), la mutazione H274Y (sostituzione della tirosina con istidina in posizione 274 nella nomenclatura N2) nella neuroaminidasi riduceva significativamente la replicazione di ceppi A(H1N1) e la loro virulenza nei topi e nei furetti, indipendentemente dal fatto che la mutazione fosse prodotta dalla mutagenesi sito-specifica, attraverso una serie di passaggi in coltura sotto l'attività del farmaco o durante il trattamento delle persone. Nei trials clinici sull'oseltamivir, la resistenza fu relativamente rara (0,32% negli adulti e 4,1% nei bambini) (4) e i pochi isolati resistenti all'oseltamivir recuperati durante il trattamento apparvero clinicamente irrilevanti. Come accaduto di recente nella stagione influenzale 2006-2007, la trasmissione dei virus influenzali resistenti all'oseltamivir era estremamente rara (6-7).

Tuttavia, gli studi realizzati da Dharan et al (8) e Gooskens et al (9) in questo numero di JAMA dimostrano che il cambiamento era nell'aria. Il 19 dicembre 2008, i Cdc riferirono che quasi tutti i casi di influenza da virus A(H1N1), il ceppo circolante predominante per la stagione, erano resistenti all'oseltamivir (10). Dharan et al (8) ampliano l'analisi a 268 virus A(H1N1) isolati, di cui 264 (98,5%) resistenti all'oseltamivir. Di tutti gli isolati influenzali tipizzati dai Cdc questa stagione, circa il 55% sono del tipo A(H1N1) resistente all'oseltamivir. (11) Questi isolati portano la mutazione H274Y a carico della sequenza proteica della neuraminidasi che conferisce resistenza all'oseltamivir, ma non pregiudica la suscettibilità allo zanamivir. Il virus influenzale del tipo A(H1N1) oseltamivir-resistente, ora in circolazione in tutti i principali continenti, (12) è simile al ceppo A/Brisbane/59/2007 che circolò durante la stagione 2007-2008 (13) ed è incluso nei vaccini antinfluenzali della stagione 2008-2009.

Gli studi di Dharan et al (8) e Gooskens et al (9) non sostengono l'idea secondo cui la resistenza all'oseltamivir compromette la virulenza. Quattro dei 142 pazienti (2,8%) con isolati A(H1N1) oseltamivir-resistenti inviati ai Cdc durante la stagione influenzale 2007-2008 sono morti di influenza. In un confronto tra i 99 casi di influenza causati da ceppi oseltamivir-resistenti e 182 casi causati da ceppi sensibili all'oseltamivir, non sono state rilevate differenze distinguibili né nei fattori predisponenti, né nei sintomi clinici, né nelle complicanze legate all'infezione influenzale.

Gooskens et al (9) descrivono un tipico focolaio nosocomiale di influenza presso il loro centro, durante la stagione 2007-2008 con una nuova allarmante complicazione - il ceppo responsabile

del focolaio epidemico era del tipo A(H1N1) resistente all'oseltamivir. Almeno 3 pazienti immunocompromessi acquisirono l'influenza dal caso indice, ciascuno di essi sviluppò polmonite e 2 morirono. Anche cinque operatori sanitari svilupparono una sindrome simil-influenzale, ma non furono testati per l'A(H1N1).

La convinzione diffusa che l'oseltamivir rimanesse efficace contro i ceppi di influenza epidemica crollò, ma questo non sorprese. Le reti di sorveglianza a livello mondiale e regionale hanno monitorato per diversi anni l'incidenza della resistenza all'inibitore della neuraminidasi nei virus influenzali in circolazione. I dati epidemiologici disponibili indicavano che la resistenza all'oseltamivir era sempre cresciuta su una traiettoria che correva parallela al brusco aumento della resistenza all'adamantane dei 3 anni precedenti (Figura). Durante la stagione 2007-2008, il 10,9% dei virus A(H1N1) testati negli Stati Uniti era oseltamivir-resistente (13). Tassi più elevati sono stati riportati anche altrove, come in Canada (26%), Europa (25%) e Hong Kong (12%) (14). Il più alto tasso di resistenza all'oseltamivir (67,3%) è stato registrato in Norvegia, un Paese in cui l'oseltamivir può essere acquistato solo con prescrizione medica ed è usato raramente (14). In uno studio dei casi in Norvegia, l'oseltamivir-resistenza non ebbe effetti sul fenotipo dell'infezione, (15) come nello studio di Dharan et al. (8). Durante l'estate del 2008, i ceppi A(H1N1) correlati al sottotipo A/Brisbane/59/2007 prevalsero nel sud del mondo e il 100% degli isolati A(H1N1) in Sud Africa risultò resistente all'oseltamivir (14).

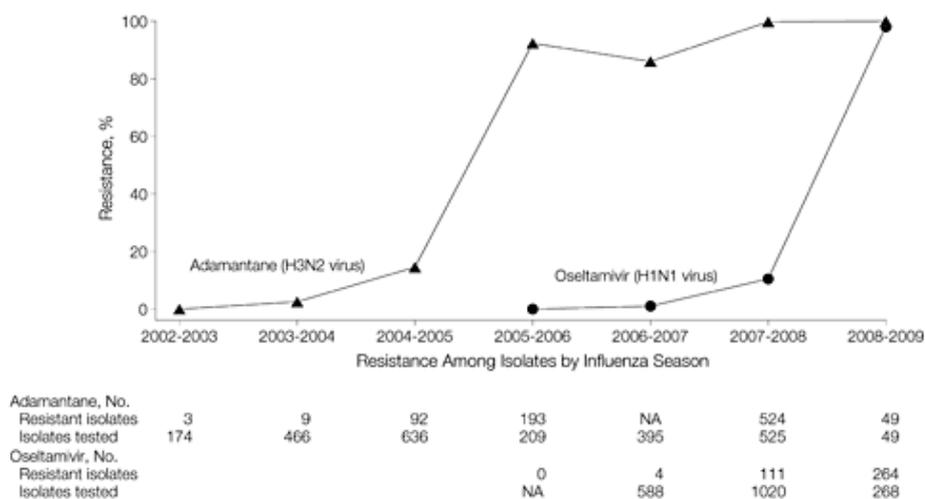


Figura. Frequenza della resistenza all'adamantane tra gli isolati virali del tipo A(H1N1) e all'oseltamivir tra gli isolati del tipo A(H3N2) inviati ai Cdc Americani. La frequenza della resistenza tra gli isolati inviati ai Cdc (1-2,7-8, 11, 13). NA indica non disponibile. Il numero di isolati A(H1N1) testati per la resistenza all'oseltamivir nel 2005-2006 e il numero di isolati A(H3N2) adamantane-resistenti nel 2006-2007 non erano disponibili. L'oseltamivir-resistenza prima della stagione influenzale 2007-2008 è stata inferiore all'1%.

Se i dati epidemiologici non sono stati sufficientemente esaustivi, studi più recenti sulla virulenza del virus A(H1N1) hanno confermato che l'H274Y non necessariamente compromette il legame al substrato, l'attività enzimatica, la replicazione virale o la virulenza nei modelli animali (16-18). Il legame della neuraminidasi con l'oseltamivir comporta un cambiamento conformazionale nella catena laterale del residuo di acido glutammico nel codone 276 (E276). Importante è che lo stesso cambiamento conformazionale non è richiesto per il legame dello zanamivir. La sostituzione di una tirosina, che ha maggiore massa dell'istidina, nel codone 274 spinge ulteriormente il gruppo carbossile E276 nel sito di legame (18).

La neuraminidasi del gruppo 1 (N1, N4, N5, N8) possiede un'altra tirosina al di sotto del sito attivo nel codone 252. La combinazione delle 2 tirosine (Y252 e Y274) perturba la tasca che

normalmente ospita l'oseltamivir. Al contrario, le neuraminidasi del gruppo 2 (N2, N3, N6, N7, N9) hanno una quantità inferiore di treonina nel codone 252 e possono contenere ancora l'oseltamivir nella tasca di legame in presenza di Y274. (18)

Lo studio strutturale offre diversi spunti. In primo luogo, la resistenza all'oseltamivir tra ceppi con le neuraminidasi del gruppo 1 era prevedibile. In secondo luogo, era meno probabile che la resistenza avesse effetti nei ceppi contenenti le neuraminidasi del gruppo 2, e questo concorda con la completa sensibilità all'oseltamivir dei ceppi A(H3N2) circolanti in questa stagione (11). In terzo luogo, zanamivir manterrà l'attività nei confronti di alcuni ceppi resistenti all'oseltamivir. In quarto luogo, nuovi inibitori possono essere creati con abilità per superare mutazioni specifiche all'interno della neuraminidasi. (19) In quinto luogo, è probabile che la resistenza all'oseltamivir si sviluppi durante il trattamento di altri ceppi contenenti N1, come quelli dell'influenza aviaria A(H5N1) (20) Quindi, le scorte di antivirali per attenuare una eventuale pandemia influenzale non dovrebbero contenere solo l'oseltamivir.

Perché un ceppo di influenza ottenga il predominio globale, deve competere con altri ceppi. Uno studio condotto da Rameix-Welti et al (16) sostiene l'interessante ipotesi secondo cui la mutazione H274Y fornisce un vantaggio competitivo al ceppo A(H1N1) circolante che è completamente indipendente dal suo effetto sull'oseltamivir. La neuraminidasi di questo ceppo è caratterizzata da un'unica combinazione di almeno 8 sostituzioni di aminoacidi, eccetto H274Y. Sia l'attività enzimatica, sia l'affinità del substrato di questa neuraminidasi (con o senza H274Y) sono significativamente più elevati rispetto alle proteine della neuraminidasi provenienti da ceppi circolanti negli anni precedenti, sebbene l'affinità venga ridotta un po' a causa della mutazione H274Y (16). Quest'ultimo punto è particolarmente degno di nota. L'"idoneità" di un ceppo influenzale dipende dall'equilibrio funzionale tra la sua emoagglutinina e le proteine della neuraminidasi. Le ulteriori mutazioni nel ceppo A(H1N1) circolante accrescono notevolmente la funzione della neuraminidasi, che disinnesta l'equilibrio. La mutazione H274Y, attraverso l'attenuazione dell'affinità del substrato della neuraminidasi, potrebbe portare le relative attività dell'emoagglutinina e della neuraminidasi nuovamente in equilibrio, rafforzando in tal modo l'idoneità complessiva dei ceppi (16).

In un editoriale che accompagnava il report 2006 sulla resistenza all'adamantane, si affermava che "un assioma di buona pratica nelle malattie infettive è che l'uso improprio di antifettivi ha come risultato inevitabile la resistenza" (3). Ma se i ceppi farmaco-resistenti possono competere con quelli sensibili in assenza di uso di antivirali, ne consegue che, per questo microrganismo, la più elementare "verità" circa la resistenza ai farmaci possa essere sbagliata.

Tra il 2002 e il 2007, l'evoluzione antigenica e genetica del virus influenzale del tipo A(H3N2), in aree del mondo anche lontane tra loro, è stata decisamente omogenea (21). Questa omogeneità supporta un modello in cui i virus epidemici circolano su scala globale piuttosto che persistere in una regione ed evolversi localmente. In realtà, vi è un network continuo di epidemie da virus A(H3N2) temporalmente sovrapposte in Asia orientale e Sud-est asiatico. Le epidemie nelle regioni temperate vengono disseminate da questo network, in genere prima in Oceania, Nord America ed Europa, e poi in Sud America (21).

La ridisseminazione in Asia orientale e nel Sud-est asiatico è rara, tanto che una volta che i ceppi del tipo A(H3N2) lasciano l'Asia orientale e il Sud-est asiatico raramente contribuiscono all'evoluzione del virus. Se la diffusione globale del virus del tipo A(H1N1) segue modelli simili a quelli dell'A(H3N2), l'ampio uso di oseltamivir non è la causa di una diffusa resistenza. Invece, è improbabile che l'uso di oseltamivir al di fuori dell'Asia orientale e del Sud-est asiatico, opportuno o meno che sia, abbia effetti sulle epidemie in Asia orientale e Sud-est asiatico, e quindi sulla prossima ondata di diffusione globale.

Questa nuova comprensione delle dinamiche dell'influenza contribuisce a spiegare la discordanza tra la frequenza dell'oseltamivir-resistenza al livello regionale e l'uso di oseltamivir durante la stagione influenzale 2007-2008. Ad esempio, l'oseltamivir-resistenza tra i ceppi del tipo A(H1N1) è stata del 67,3% in Norvegia, dove l'oseltamivir è raramente utilizzato, ma è stata solo del 3% in Giappone, il Paese con il più alto impiego pro-capite di oseltamivir (14).

Mentre i tassi di A(H1N1) oseltamivir-resistenza rimangono elevati, i pazienti che sono candidati per il trattamento dell'influenza o per la chemioprophilassi dovrebbero ricevere lo zanamivir o la combinazione di oseltamivir e rimantidina (o amantidine, se la rimantidina non è disponibile) (10). Essenzialmente tutti i ceppi di influenza del tipo A(H3N2) circolanti quest'anno sono resistenti alle adamantidine ma suscettibili a entrambi gli inibitori della neuraminidasi. Pertanto, il solo oseltamivir risulta appropriato solo per il raro paziente che ha un'infezione nota per essere causata da influenza di tipo A(H3N2) o B.

Data la necessità di una duplice terapia o di zanamivir per via inalatoria, che possono essere difficili da gestire e tollerare, deve essere valutato caso per caso il rischio/beneficio per il trattamento empirico di un adulto sano con una sindrome simil-influenzale. I test rapidi per la diagnosi di influenza sono insensibili, quindi la decisione dovrebbe in primo luogo essere presa sulla base del rischio del paziente di manifestare complicazioni connesse all'influenza e delle caratteristiche epidemiologiche locali dei virus influenzali circolanti.

La vaccinazione rimane la pietra miliare di un impegno a livello mondiale per il controllo della diffusione dell'influenza. Uno studio di Wang et al (22) fornisce una maggiore conoscenza dei benefici assoluti e relativi del vaccino trivalente inattivato (TIV) e del vaccino vivo attenuato contro l'influenza (LAIV). Gli autori hanno esaminato le visite mediche effettuate per influenza e polmonite in più di un milione di soldati dell'esercito americano in servizio effettivo tra il 2004 e il 2007. In questa giovane e sana popolazione con coperture vaccinali annuali tra il 50% e l'80%, il TIV è stato associato a una riduzione delle visite mediche per influenza e polmonite effettuate dal 30% al 55% rispetto al placebo. Questi risultati sono simili a quelli di precedenti studi e sono migliori dei risultati ottenuti utilizzando il LAIV, che ha superato il placebo solo per i vaccinati che erano relativamente "naive" al vaccino.

Gli autori ipotizzano che poiché i ceppi contenuti nel LAIV devono replicarsi nel ricevente per stimolare efficacemente la specifica immunità nei confronti dei virus influenzali, la presenza di anticorpi neutralizzanti da precedenti vaccinazioni o da naturale infezione può evitare questa replicazione e quindi compromettere l'efficacia del LAIV. Sia uno studio randomizzato (23-24) sia una meta-analisi (25) hanno confrontato il TIV con il LAIV negli adulti ed entrambi hanno riportato un vantaggio nell'uso del TIV. Non sorprende che il LAIV sia altrettanto o forse anche più efficace nei bambini, che presumibilmente mancano di una preesistente immunità specifica all'influenza (26-27).

Resta da vedere quali conseguenze avranno questi nuovi risultati di Wang et al (22) sulle raccomandazioni per la vaccinazione antinfluenzale. Durante le tipiche stagioni influenzali, può essere ragionevole utilizzare il TIV nei pazienti che sono stati vaccinati almeno una volta negli ultimi 2 anni. D'altro canto, i vaccini vivi attenuati contro ceppi pandemici possono essere più efficaci dei vaccini inattivati, quando la popolazione presumibilmente mancherà di una preesistente immunità.

La comprensione della biologia e dell'epidemiologia dell'influenza è progredita notevolmente; tuttavia, la diffusione globale di ceppi di virus influenzali oseltamivir-resistenti è giunta come una vera sorpresa. Indubbiamente, nuove sorprese attendono la costante lotta contro l'influenza, perché di una cosa si può essere certi - il microrganismo continuerà a evolversi. Anticipare i rapidi e infiniti mutamenti nella biologia e nelle dinamiche dell'influenza richiederà una diagnostica più veloce nel caratterizzare i campioni dal punto di vista molecolare, un'estesa sorveglianza tra gli esseri umani e gli animali, e sistemi più rapidi e duttili per tradurre le scoperte basilari ed epidemiologiche in interventi clinicamente applicabili. Per ora, i migliori strumenti per mitigare l'influenza sono la vaccinazione, le misure di distanziamento sociale, il lavaggio delle mani e le norme igienico-sanitarie di base.

## Riferimenti

1. Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA*. 2006;295(8):891-894. [FREE FULL TEXT](#)
2. Bright RA, Medina MJ, Xu X; et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*. 2005;366(9492):1175-1181. [PUBMED](#)
3. Weinstock DM, Zuccotti G. Adamantane resistance in influenza A. *JAMA*. 2006;295(8):934-936. [FREE FULL TEXT](#)
4. Aoki FY, Boivin G, Roberts N. Influenza virus susceptibility and resistance to oseltamivir. *Antivir Ther*. 2007;12(4 pt B):603-616. [PUBMED](#)
5. Ives JA, Carr JA, Mendel DB; et al. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Res*. 2002;55(2):307-317. [PUBMED](#)
6. Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C; et al. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(7):2395-2402. [FREE FULL TEXT](#)
7. Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M; et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(9):3284-3292. [FREE FULL TEXT](#)
8. Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ; et al, Oseltamivir-Resistance Working Group. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA*. 2009;301(10): (doi: 10.1001/jama.2009.294).
9. Gooskens J, Jonges M, Claas ECJ, Meijer A, van den Broek PJ, Kroes ACM. Morbidity and mortality associated with nosocomial transmission of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus. *JAMA*. 2009;301(10): (doi: 10.1001/jama.2009.297).
10. Centers for Disease Control and Prevention. CDC Issues Interim Recommendations for the Use of Influenza Antiviral Medications in the Setting of Oseltamivir Resistance among Circulating Influenza A(H1N1) Viruses, 2008-09 Influenza Season. <http://www2a.cdc.gov/HAN/ArchiveSys/ViewMsgV.asp?AlertNum=00279>. Accessed February 12, 2009.
11. Centers for Disease Control and Prevention. FluView: 2008-2009 Influenza Season Week ending January 31, 2009. <http://www.cdc.gov/flu/weekly/>.
12. World Health Organization. Influenza A(H1N1) virus resistance to oseltamivir—2008/2009 influenza season, 22 January 2009. [http://www.who.int/csr/disease/influenza/H1N120090122\\_final.pdf](http://www.who.int/csr/disease/influenza/H1N120090122_final.pdf). Accessed February 12, 2009.
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Influenza activity—United States and worldwide, 2007-08 season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008;57(25):692-697. [PUBMED](#)
14. World Health Organization. Table: Influenza A(H1N1) Virus Resistance to Oseltamivir: Last Quarter 2007 to 2 June 2008 (Update 13 June 2008). <http://www.who.int/csr/disease/influenza/ResistanceTable200806013.pdf>. Accessed February 12, 2009.
15. Hauge SH, Dudman S, Borgen K, Lackenby A, Hungnes O. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(2):155-162. [PUBMED](#)
16. Rameix-Welti MA, Enouf V, Cuvelier F, Jeannin P, van der Werf S. Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog*. 2008;4(7):e1000103. [PUBMED](#)
17. Baz M, Abed Y, Nehme B, Boivin G. Activity of the oral neuraminidase inhibitor A-322278 against the oseltamivir-resistant H274Y (A/H1N1) influenza virus mutant in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):791-793. [FREE FULL TEXT](#)
18. Collins PJ, Haire LF, Lin YP; et al. Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature*. 2008;453(7199):1258-1261. [PUBMED](#)
19. Hayden F. Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? *Clin Infect Dis*. 2009;48(suppl 1):S3-S13. [PUBMED](#)
20. Abdel-Ghafar AN, Chotpitayasunondh T, Gao Z; et al, Writing Committee of the Second World Health Organization Consultation on Clinical Aspects of Human Infection With Avian Influenza A (H5N1) Virus. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N Engl J Med*. 2008;358(3):261-273. [FREE FULL TEXT](#)
21. Russell CA, Jones TC, Barr IG; et al. The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science*. 2008;320(5874):340-346. [FREE FULL TEXT](#)
22. Wang Z, Tobler S, Roayaei J, Eick A. Live attenuated or inactivated influenza vaccines and medical encounters for respiratory illnesses among US military personnel. *JAMA*. 2009;301(9):945-953.
23. Ohmit SE, Victor JC, Rotthoff JR; et al. Prevention of antigenically drifted influenza by inactivated and live attenuated vaccines. *N Engl J Med*. 2006;355(24):2513-2522. [FREE FULL TEXT](#)
24. Ohmit SE, Victor JC, Teich ER; et al. Prevention of symptomatic seasonal influenza in 2005-2006 by inactivated and live attenuated vaccines. *J Infect Dis*. 2008;198(3):312-317. [PUBMED](#)

- [25.](#) Jefferson TO, Rivetti D, Di Pietrantonj C, Rivetti A, Demicheli V. Vaccines for preventing influenza in healthy adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; (2):CD001269. [PUBMED](#)
- [26.](#) Jefferson T, Rivetti A, Harnden A, Di Pietrantonj C, Demicheli V. Vaccines for preventing influenza in healthy children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; (2):CD004879. [PUBMED](#)
- [27.](#) Belshe RB, Edwards KM, Vesikari T; et al, CAIV-T Comparative Efficacy Study Group. Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children. *N Engl J Med.* 2007; 356(7):685-696. [FREE FULL TEXT](#)